



TITLE:

# 血流低下に伴う脳機能障害に果たすTRPチャネルの病態生理学的役割の解明( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

宮之原, 遵

---

CITATION:

宮之原, 遵. 血流低下に伴う脳機能障害に果たすTRPチャネルの病態生理学的役割の解明. 京都大学, 2018, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21046>

RIGHT:

許諾条件により要旨は2018-04-01に公開

京都大学	博 士 ( 薬科学 )	氏 名	宮之原 遵
論文題目	血流低下に伴う脳機能障害に果たすTRPチャネルの病態生理学的役割の解明		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>脳血流低下による酸素・栄養供給不全には、急性的な血管閉塞によるものと、慢性的な低灌流によるものがあるが、いずれも深刻な高次脳機能障害の成因となり得る。これらの病態にはグリア細胞や末梢由来免疫細胞の異常活性化が関与することが示されつつあるが、その病態メカニズムには不明な点が多い。Transient receptor potential (TRP) チャネルはリガンド作動性カチオンチャネルの一群であり、その一部は脳や免疫系の細胞に広く分布し、炎症環境を感知することが知られている。本研究では、第1章において TRPV1 に、第2章および第3章では TRPM2 に着目して以下の検討を行った。</p> <p>第1章 マウス急性虚血性脳卒中モデルにおけるTRPV1の病態生理学的役割</p> <p>本章では、急性虚血性脳卒中に対する治療標的としてのTRPV1の有用性を検討するために、マウス中大脳動脈閉塞モデルを用いて評価を行った。TRPV1遺伝子欠損マウスおよびTRPV1拮抗薬capsazepineを用いた検討により、本病態における神経症状や運動機能の増悪および梗塞巣増大にTRPV1が寄与することが明らかとなった。</p> <p>第2章 マウス慢性脳低灌流モデルにおけるTRPM2欠損の影響</p> <p>慢性脳低灌流は、加齢や動脈硬化、極度のストレスなどの様々な因子により生じ、アルツハイマー型や脳血管性の認知症のみならず、うつ病や統合失調症といった認知機能障害を伴う中枢神経疾患の発症リスクも高めることが知られている。そこで本研究では、TRPM2遺伝子欠損 (TRPM2-KO) マウスを用いて慢性脳低灌流の病態におけるTRPM2の関与を検討した。</p> <p>慢性脳低灌流の病態をマウスで再現するために、野生型 (WT) およびTRPM2-KOマウスに微小金属コイル装着による両側総頸動脈狭窄 (BCAS) を施した。BCAS処置28日後のWTマウスでは認知機能障害および白質傷害が認められたのに対して、TRPM2-KOマウスではそれらが顕著に抑制されていた。</p> <p>そこで白質におけるTRPM2の病態生理学的役割を詳細に解析するために、脳梁部において更なる評価を行った。BCAS処置14、28日後における血液脳関門の破綻の程度およびTRPM2の内因性活性化物質である過酸化水素の含有量は両遺伝子型で同程度だった。一方、WTマウスでは炎症性サイトカインであるIL1<math>\beta</math>、TNF<math>\alpha</math>およびIL6が増加したのに対し、TRPM2-KOマウスではそれらの産生が抑制されていた。</p> <p>これらの結果より、慢性脳低灌流における炎症性サイトカイン産生、白質傷害お</p>			

よび認知機能障害にTRPM2が寄与することが示された。

### 第3章 ミクログリアに発現するTRPM2の慢性脳低灌流における病態への関与

慢性脳低灌流の病態生理においてどの細胞に発現するTRPM2が重要であるかを明らかにするために、脳梁部における免疫組織化学的検討を行った。BCAS処置14、28日後においてアストロサイトと想定されるGFAP陽性細胞数の増加が認められたが、両遺伝子型において差は認められなかった。ミクログリア／マクロファージと想定されるIba1陽性細胞数を定量したところ、WTマウスでは顕著な増加が認められたが、TRPM2-KOマウスではその増大は抑制されていた。続いて、脳梁部におけるミクログリア／マクロファージ関連遺伝子の発現変動を解析したところ、WTマウスで認められたCX3CR1、MHCIIおよびCD68の発現上昇がTRPM2-KOマウスでは抑制されていた。TLR4およびCD14の発現上昇の程度については両遺伝子型で差は認められなかった。TREM2に関してはBCAS処置による発現変動は確認されなかった。さらに、ミクログリア／マクロファージの活性化抑制薬であるminocyclineを投与したところ、認知機能障害が抑制されたことから、ミクログリアまたはマクロファージが病態増悪に関与することが示された。

また、海馬においても脳梁部と同様に解析した。CA1、CA3および歯状回において、GFAPおよびIba1陽性細胞数ならびにCX3CR1の発現量は脳梁部と同様の変化が認められた。一方、IL1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ およびIL6ならびにCX3CL1の発現増加は観察されず、CA1、CA3および歯状回における神経細胞数の変化も認められなかったことから、海馬における変化が本病態に影響する可能性は小さいことが示唆された。

脳常在性のミクログリアと末梢由来の浸潤マクロファージのどちらが慢性脳低灌流の病態形成に寄与するのかを検討するために、末梢骨髄をGFP標識したキメラマウスにおいてBCAS処置を行った。その結果、脳梁部に集積したIba1陽性細胞はGFPを共発現しなかったことから、Iba1陽性細胞は脳常在性のミクログリアであることが示された。さらに、WTマウス由来の末梢骨髄に置換したTRPM2-KOマウスでも、Iba1陽性細胞数の増加、成熟オリゴデンドロサイトと想定されるGSTpi陽性細胞数の減少および認知機能障害が抑制された。逆に、TRPM2-KOマウス由来の末梢骨髄に置換したWTマウスにおいては認知機能障害の抑制は認められなかった。

これらの結果より、ミクログリアに発現するTRPM2が慢性脳低灌流に伴う白質傷害および認知機能障害の病態に関与することが明らかとなった。

以上、著者は各種マウスモデルを用いて、血流低下に伴う脳機能障害に果たすTRPチャネルの病態生理学的役割の一端を明らかにした。本研究の成果は、脳血流低下が関与する様々な中枢神経疾患に対する治療薬の開発に資する重要な基礎的知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

脳血流低下による酸素・栄養供給不全には、急性的な血管閉塞によるものと、慢性的な低灌流によるものがあるが、いずれも深刻な高次脳機能障害の成因となり得る。これらの病態にはグリア細胞や末梢由来免疫細胞の異常活性化が関与することが示されつつあるが、その病態メカニズムには不明な点が多い。Transient receptor potential (TRP) チャネルはリガンド作動性カチオンチャネルの一群であり、その一部は脳や免疫系の細胞に広く分布し、炎症環境を感知することが知られている。本研究で申請者は、第1章においてTRPV1に、第2章および第3章ではTRPM2に着目して以下の検討を行った。

第1章 マウス急性虚血性脳卒中モデルにおけるTRPV1の病態生理学的役割

まず急性虚血性脳卒中に対する治療標的としてのTRPV1の有用性を検討するために、申請者はマウス中大脳動脈閉塞モデルを用いて評価を行った。TRPV1遺伝子欠損マウスおよびTRPV1拮抗薬capsazepineを用いた検討により、本病態における神経症状や運動機能の増悪および梗塞巣増大にTRPV1が寄与することが明らかとなった。

第2章 マウス慢性脳低灌流モデルにおけるTRPM2欠損の影響

慢性脳低灌流は、加齢や動脈硬化、極度のストレスなどの様々な因子により生じ、アルツハイマー型や脳血管性の認知症のみならず、うつ病や統合失調症といった認知機能障害を伴う中枢神経疾患の発症リスクも高めることが知られている。そこで申請者は、TRPM2遺伝子欠損 (TRPM2-KO) マウスを用いて慢性脳低灌流の病態におけるTRPM2の関与を検討した。

慢性脳低灌流の病態をマウスで再現するために、野生型 (WT) およびTRPM2-KOマウスに微小金属コイル装着による両側総頸動脈狭窄 (BCAS) を施した。BCAS処置28日後のWTマウスでは認知機能障害および白質傷害が認められたのに対して、TRPM2-KOマウスではそれらが顕著に抑制されていた。

そこで白質におけるTRPM2の病態生理学的役割を詳細に解析するために、脳梁部において更なる評価を行った。BCAS処置14、28日後における血液脳関門の破綻の程度およびTRPM2の内因性活性化物質である過酸化水素の含有量は両遺伝子型で同程度だった。一方、WTマウスでは炎症性サイトカインであるIL1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ およびIL6が増加したのに対し、TRPM2-KOマウスではそれらの産生が抑制されていた。

これらの結果より、慢性脳低灌流における炎症性サイトカイン産生、白質傷害および認知機能障害にTRPM2が寄与することが示された。

第3章 ミクログリアに発現するTRPM2の慢性脳低灌流における病態への関与

慢性脳低灌流の病態生理においてどの細胞に発現するTRPM2が重要であることを明らかにするために、申請者は脳梁部における免疫組織化学的検討を行った。

BCAS処置14、28日後においてアストロサイトと想定されるGFAP陽性細胞数の増加が認められたが、両遺伝子型において差は認められなかった。ミクログリア/マクrofageと想定されるIba1陽性細胞数を定量したところ、WTマウスでは顕著な増

加が認められたが、TRPM2-KOマウスではその増大は抑制されていた。続いて、脳梁部におけるミクログリア／マクロファージ関連遺伝子の発現変動を解析したところ、WTマウスで認められたCX3CR1、MHCIIおよびCD68の発現上昇がTRPM2-KOマウスでは抑制されていた。TLR4およびCD14の発現上昇の程度については両遺伝子型で差は認められなかった。TREM2に関してはBCAS処置による発現変動は確認されなかった。さらに、ミクログリア／マクロファージの活性化抑制薬であるminocyclineを投与したところ、認知機能障害が抑制されたことから、ミクログリアまたはマクロファージが病態増悪に関与することが示された。

また、海馬においても脳梁部と同様に解析した。CA1、CA3および歯状回において、GFAPおよびIba1陽性細胞数ならびにCX3CR1の発現量は脳梁部と同様の変化が認められた。一方、IL1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ およびIL6ならびにCX3CL1の発現増加は観察されず、CA1、CA3および歯状回における神経細胞数の変化も認められなかったことから、海馬における変化が本病態に影響する可能性は小さいことが示唆された。

脳常在性のミクログリアと末梢由来の浸潤マクロファージのどちらが慢性脳低灌流の病態形成に寄与するのかを検討するために、末梢骨髄をGFP標識したキメラマウスにおいてBCAS処置を行った。その結果、脳梁部に集積したIba1陽性細胞はGFPを共発現しなかったことから、Iba1陽性細胞は脳常在性のミクログリアであることが示された。さらに、WTマウス由来の末梢骨髄に置換したTRPM2-KOマウスでも、Iba1陽性細胞数の増加、成熟オリゴデンドロサイトと想定されるGSTpi陽性細胞数の減少および認知機能障害が抑制された。逆に、TRPM2-KOマウス由来の末梢骨髄に置換したWTマウスにおいては認知機能障害の抑制は認められなかった。

これらの結果より、ミクログリアに発現するTRPM2が慢性脳低灌流に伴う白質傷害および認知機能障害の病態に関与することが明らかとなった。

以上、申請者は各種マウスモデルを用いて、血流低下に伴う脳機能障害に果たすTRPチャネルの病態生理学的役割の一端を明らかにした。本研究の成果は、脳血流低下が関与する様々な中枢神経疾患に対する治療薬の開発に資する重要な基礎的知見を提供するものである。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成30年2月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 平成30年 4月 1日以降